

SEPTIEMBRE 2017

Aplicación de la Transglutaminasa como ingrediente funcional para mejorar las propiedades tecnológicas en yogur y queso fresco



Elisabet Miró Fuertes

Facultad de Veterinaria

Universidad Autónoma de Barcelona

Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos

Máster Oficial de Calidad de Alimentos de Origen Animal

Trabajo de Fin de Máster

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer al equipo de Ensis Sciences S.L y en especial a Ramsés, Gerard y Laura por prestarme sus instalaciones para poder ejercer el trabajo de final de máster y por su ayuda durante mi estancia de prácticas

Agradecer también al tutor Jordi Saldo por su ayuda durante el redactado de la memoria y las horas dedicadas en las tutorías para el trabajo, así como, en el análisis estadístico.

Por último, gracias a mis padres por la ayuda y motivación durante la parte final del trabajo.

Informe del supervisor y tutor del trabajo de investigación

Jordi Saldo Periago Profesor del área de Tecnología de los Alimentos de la Universitat Autònoma de Barcelona,

INFORMA Que el trabajo de investigación titulado: “Efecto de la sustitución del cloruro sódico por cloruro potásico en emulsiones cárnicas” ha sido realizado bajo mi supervisión o tutela dentro del módulo Trabajo Fin de Máster del Máster Oficial de Calidad de Alimentos de Origen Animal de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Facultad de Veterinaria, 4 de septiembre de 2017

ÍNDICE

Resumen.....	1
Abstract	1
1. Introducción	2
2. Marco teórico	2
2.1 ¿Qué es la TGasa?	2
2.2 Obtención y características principales de la TGasa	4
2.3. La TGasa según la legislación.....	6
2.4. Funciones de la TGasa en alimentos	7
2.4.1. TGasa en yogur y queso fresco	8
3. Materiales y metodología	12
3.1 Introducción al experimento.....	12
3.2 Yogur.....	13
3.2.1 Diseño, planificación y elaboración del experimento	13
3.2.2 Análisis del perfil de textura: dureza del gel	14
3.2.3 Análisis de la viscosidad	14
3.2.4 Determinación de la sinéresis forzada.....	15
3.2.5 Determinación de pH.....	15
3.2.6 Análisis estadístico	15
3.3 Queso fresco	15
3.3.1 Diseño, planificación y elaboración del experimento	15
3.3.2 Análisis del perfil de textura: dureza de la cuajada	17
3.3.3 Obtención del peso de la cuajada y peso del desuerado espontaneo	17
3.3.4 Determinación del rendimiento quesero.....	17
3.3.5 Recogida de datos.....	17
4. Resultados y discusión	18
4.1 Resultados y discusión del yogur	18
4.1.1 Dureza del gel.....	19
4.1.2 Viscosidad	21
4.1.3. Sinéresis forzada.....	22
4.1.4. pH.....	23
4.2 Resultados y discusión del queso	23
4.2.1 Dureza de la cuajada.....	24

4.2.2 Pesos de los quesos y desuerado espontáneo durante la cuajada	25
4.2.3. Rendimiento quesero e incremento en rendimiento	26
5. Futuras mejoras	28
6. Conclusiones	28
6.Bibliografía.....	29
Figura 1: Unión de proteínas (Pagani, 2015).....	3
Figura 2: Reacciones catalizadas por la TGasa: (A) Reacción de acil-transferencia, (B) Reacción de entrecruzamiento, (C) Desaminación (Caro Calderón, 2011)	4
Figura 3: Condiciones óptimas de la TGasa (Pagani, 2015)	5
Figura 4: Relación de la inactivación enzimática en referencia a la temperatura (Pagani, 2015)	5
Figura 5: Grado de especificidad por los sustratos de la TGasa (Fuente: adaptación de (Barreiro & Seselovsky, 2003)).....	6
Figura 6: Queso control A (Izquierda)/queso con TGasa B (derecha)	28
Tabla 1: Principales funciones de la transglutaminasa.....	8
Tabla 2:Propiedades de la TGasa en yogur y queso (Carlos & Carreño, 2007)	8
Tabla 3: Formulación de los yogures. Todos los yogures compartían la composición del yogur B (leche y fermento a 0,3%)	13
Tabla 4:Formulaciones del queso fresco. Todos los quesos contenían 0,5 ml de cuajo; 0,5 ml de CaCl ₂ ; 1% de sal sobre el peso de cuajada y 0,15 g de fermento en 1 L de leche en cada elaboración de queso.....	16
Tabla 5: Resultados estadísticos de los yogures A0 (TGasa 0,1 %), B, C0 (TGasa 0,1 %), D y los comerciales. Los valores con el mismo superíndice para cada variable no son distintos con p=0,05.....	18
Tabla 6: Resultados de los yogures A y C con TGasa comparados con yogur D con leche en polvo. Los valores con el mismo superíndice para dureza no son distintos con p=0,05. Para las variables de viscosidad y desuerado forzado las muestras no presentaron diferencias significativas.....	19
Tabla 7: Resultados de los quesos de cada medida representado con las medias. Los resultados de rendimiento fueron en función del peso a las 24 h.	24
Gráfico 1: Relación entre resultados en dureza de los yogures A y C con varias dosis y diferente momento de aplicación respecto al yogur D con leche en polvo.	20
Gráfico 2: Relación entre resultados de viscosidad (cP) de los yogures A y C con varias dosis y diferente momento de aplicación respecto al yogur D con leche en polvo	21
Gráfico 3: Relación entre resultados en sinéresis de los yogures A y C con varias dosis y diferente momento de aplicación respecto al yogur D con leche en polvo.	22
Gráfico 4: Diferencias en dureza expresada en N entre los dos quesos elaborados	25
Gráfico 5. Diferencias entre pesos y desuerado en los quesos	26
Gráfico 6. Diferencias de rendimiento quesero entre los quesos	27

Resumen

La transglutaminasa es una enzima que se encuentra de forma natural en la mayoría de tejidos animales y está relacionada con varios procesos biológicos. Esta enzima actúa únicamente en proteínas catalizando la reacción de formación de enlaces covalentes entre residuos de glutamina y lisina entre proteínas de distinto tipo y origen. El añadir transglutaminasa en nuevas formulaciones confiere al producto nuevas propiedades en la estructura y acabado de los mismos aumentando su valor añadido.

En este estudio se analiza cómo afecta la aplicación de esta enzima en el yogur y en el queso fresco. En el primero sustituyendo la leche en polvo por la transglutaminasa para ver cómo afecta a sus propiedades tecnológicas, mientras que, en queso se quiere ver si se produce un aumento del rendimiento quesero. Los resultados nos permiten afirmar que se observó que, en el caso del yogur, la sustitución de la leche en polvo dio unos mejores resultados en dureza, viscosidad, pH y sinéresis. En el queso se observó que si se añade un 0,1% de la enzima al queso obtenemos casi un 20% de incremento en rendimiento quesero. La dosis de transglutaminasa y su momento de adición en la elaboración son dos partes claves en el estudio.

Abstract

Transglutaminase is an enzyme found naturally in most animal tissues and is involved in several biological processes. This enzyme acts only on proteins catalyzing the reaction of formation of covalent bonds between residues of glutamine and lysine between proteins of different type and origin. The addition of transglutaminase in new product formulations gives the product new properties in the structure increasing its added value.

In this study, we intend to see how it affects the application of this enzyme in yogurt and fresh cheese. In yogurt, we want to substitute the milk powder for transglutaminase and see how it affects its technological properties, while in cheese we want to see if there is an increase in cheese yield. It was observed that substitution of milk powder gave better results in hardness, viscosity, pH and syneresis. In the cheese, it was observed that if 0.1% of the enzyme is added to the cheese, we obtain almost a 20% increase in cheese yield. The dose of transglutaminase and its time of addition in the elaboration are two key parts in the study.

1. Introducción

El creciente interés de los consumidores por su salud y bienestar ha obligado cada vez más a la industria a desarrollar e innovar en productos con una mejor calidad y mejores características tecnológicas al menor costo posible. El uso de ingredientes innovadores puede ser la clave para alcanzar dicho objetivo (Aguilar-Zárate, Aguilar-Zárate, Carrillo Inungaray, Portilla Rivera, & Alonso, 2012). Las enzimas se utilizan desde hace siglos para mejorar la textura, la apariencia y el valor nutricional de algunos alimentos. Entre todas las enzimas, destaca la transglutaminasa (TGasa). En los últimos años la TGasa ha ido generando un gran interés en el campo de la industria alimentaria como ingrediente funcional para mejorar las propiedades tecnológicas de varios productos sobre todo a base de proteína y por su habilidad única de modificar la funcionalidad de las proteínas debido a entrecruzados covalentes (Shleikin, Gorbatsky, & Danilov, 2008).

En la industria láctea se está investigando la aplicación de TGasa en productos como helados, yogures, quesos con el fin de obtener productos con unas propiedades superiores a las que existen actualmente en el mercado. Al mismo tiempo, estas mejoras cualitativas supondrían una ventaja económica respecto al precio de los productos existentes. Por esta razón, en este estudio, se ha querido estudiar cómo afecta la adición de TGasa en yogur y queso fresco.

El presente estudio se realizó en Ensis Sciences S.L, una empresa dedicada a la comercialización de ingredientes funcionales que ofrece soluciones alimentarias que responden a nuevas necesidades de los consumidores. Partiendo de la base de estudios anteriores con TGasa en estos productos, este trabajo experimental tuvo como objetivo corroborar si con la enzima propia de la empresa se mejoran las propiedades tecnológicas en el yogur y el rendimiento quesero.

A continuación, el estudio presentará una parte teórica seguida de la explicación detallada del experimento con los objetivos junto con los resultados y discusión finalizando con una breve conclusión del estudio.

2. Marco teórico

2.1 ¿Qué es la TGasa?

La transglutaminasa -Glutaminil-péptido gamma-Glutamil Transferasa-, es una enzima transferasa (EC 2.3.2.13) que cataliza las reacciones de entrecruzamiento entre los grupos γ -carboxiamida de

los residuos de glutamina y los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina formando enlaces de proteínas ϵ -(γ -glutamil) lisina (Carlos & Carreño, 2007).

La mayoría de las enzimas comerciales actualmente existentes promueven la hidrólisis de sustratos, como por ejemplo amilasas y proteasas. La TGasa es una enzima que cataliza la polimerización y unión cruzada de proteínas como se puede ver en la Figura 1.

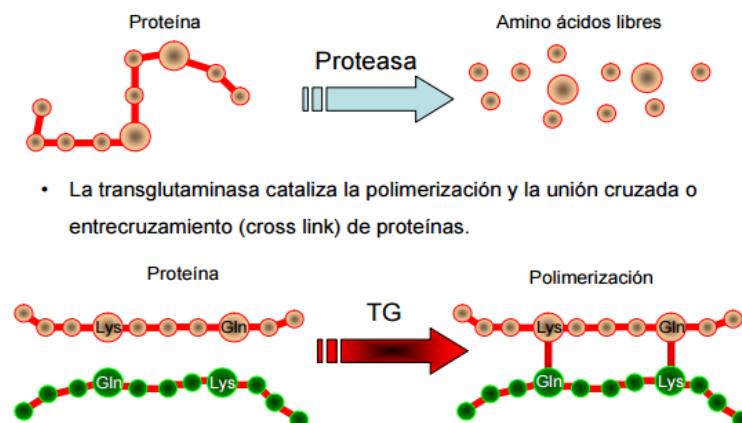


Figura 1: Unión de proteínas (Pagani, 2015)

Esta enzima cataliza la modificación postraducciona de proteínas, principalmente mediante entrecruzamiento proteína-proteína, pero también a través de la conjugación covalente de poliaminas, esterificación de lípidos, o la desaminación de residuos de glutamina. Cuando un grupo ϵ -amino de lisina actúa como receptor de grupos acil, resulta en una polimerización y un entrecruzado molecular de las proteínas vía formación de enlaces ϵ -(γ -glutamil) lisina (ver Figura 2) (Aguilar-Zárate et al., 2012; Alvarez Anchundia, 2015). Los aminoácidos que forman el sitio catalítico de la transglutaminasa son la cisteína (Cys), histidina (His) y aspartato (Asp) (Carlos & Carreño, 2007).

Para la producción de la TGasa se utilizan fuentes de carbono en las que destacan azúcares como glucosa, lactosa glicerol, etc. Un prerrequisito para esta reacción de entrecruzamiento es la disponibilidad de suficientes lisinas y glutaminas para la formación de enlaces covalentes adicionales hasta que se agotan (Mounsey et al., 2005).

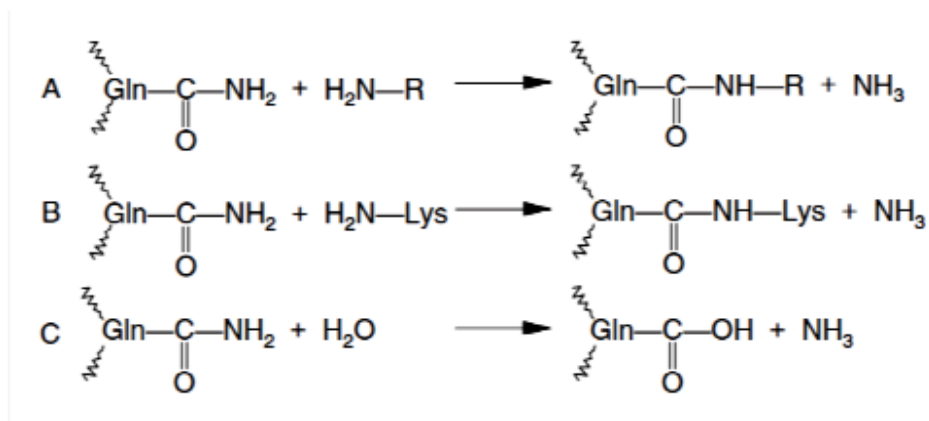


Figura 2: Reacciones catalizadas por la TGasa: (A) Reacción de acil-transferencia, (B) Reacción de entrecruzamiento, (C) Desaminación (Caro Calderón, 2011)

2.2 Obtención y características principales de la TGasa

La transglutaminasa se puede encontrar en plantas, mamíferos y microorganismos. Las TGasas que provienen de organismos eucariotas son dependientes del calcio, mientras que las TGasas obtenidas de origen microbiano son independientes del calcio (Vergara Olivares, 2011).

Inicialmente la TGasa se extraía de tejidos u órganos, pero en escasa cantidad y de una calidad media con una aplicación difícil en alimentos (Barreiro & Seselovsky, 2003). A principios de los años 80 se realizaron los primeros experimentos relacionados con la actividad de la TGasa en alimentos, donde se utilizó la TGasa extraída de hígado de cobaya y de plasma bovino (Motoki & Seguro, 1998). La aceptabilidad y el uso de extractos de hígado de cerdo como fuente de TGasa fue desfavorable para su aplicación industrial (Motoki & Kumazawa, 2000).

La fermentación microbiana en la década de 1980 permitió obtener TGasas por producción masiva a partir de sustratos de más bajo costo. La primera TGasa de origen microbiano que se caracterizó fue la enzima obtenida de la bacteria *Streptomyces mobarensis*, proteína monomérica de 331 aminoácidos (Ando et al., 1989). Posteriormente a esta caracterización se identificaron otros microorganismos con capacidad para producir la enzima. Entre ellos se encuentran *Streptoverticillium griseocaneum*, *S. cinnamoneum subesp. Cinnamoenum* y *S. mobarense* sp., así como *Streptomyces* sp (Ando et al., 1989; Motoki & Seguro, 1998). Este proceso de fermentación se realiza en condiciones controladas y se utilizan cepas de alto rendimiento como las mencionadas anteriormente. El filtrado o sobrenadante que contiene la enzima se concentra o se precipita para obtener la enzima en forma de polvo (Nonaka et al., 1989).

Son varios los factores que influyen en la actividad enzimática y en la estabilidad de la enzima. Entre ellos destacan la temperatura y pH, factores de inactivación y especificidad de la enzima en diferentes sustratos:

1) Temperatura y pH: Una alta temperatura requiere un tiempo de reacción más corto. La actividad enzimática es óptima a una temperatura de unos 50-55 °C y cubre un amplio rango de pH de 4,5 a 9, siendo el óptimo entre 6 y 7. La TGasa es inactivada a altas temperaturas y es inestable a pH extremos (Figura 3).

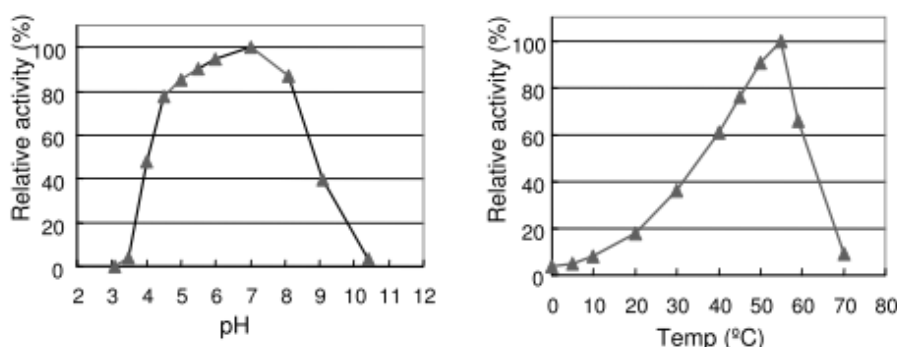


Figura 3: Condiciones óptimas de la TGasa (Pagani, 2015)

2) Factores de inactivación: La TGasa puede ser inactivada por un aumento de la temperatura más allá de los 70 °C. El tiempo de reacción de esta enzima depende directamente de la temperatura (ver Figura 4).

BINOMIO TIEMPO X TEMPERATURA		INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA	
Temperatura	Tiempo	Temp. Interna	Tiempo para Inactivación
5°C	240 min	65°C	2h o más
15°C	105 min	70°C	Dentro de 15 min
20°C	70 min	75°C	Dentro de 5 min
30°C	35 min	80°C	Dentro de 1 min
40°C	20 min		

Figura 4: Relación de la inactivación enzimática en referencia a la temperatura (Pagani, 2015)

3) Especificidad de sustratos: Las proteínas que presentan terminaciones Lisina o Glutamina son excelentes sustratos (Barreiro & Seselovsky, 2003). En la Figura 5 se muestran los diferentes sustratos y su especificidad.

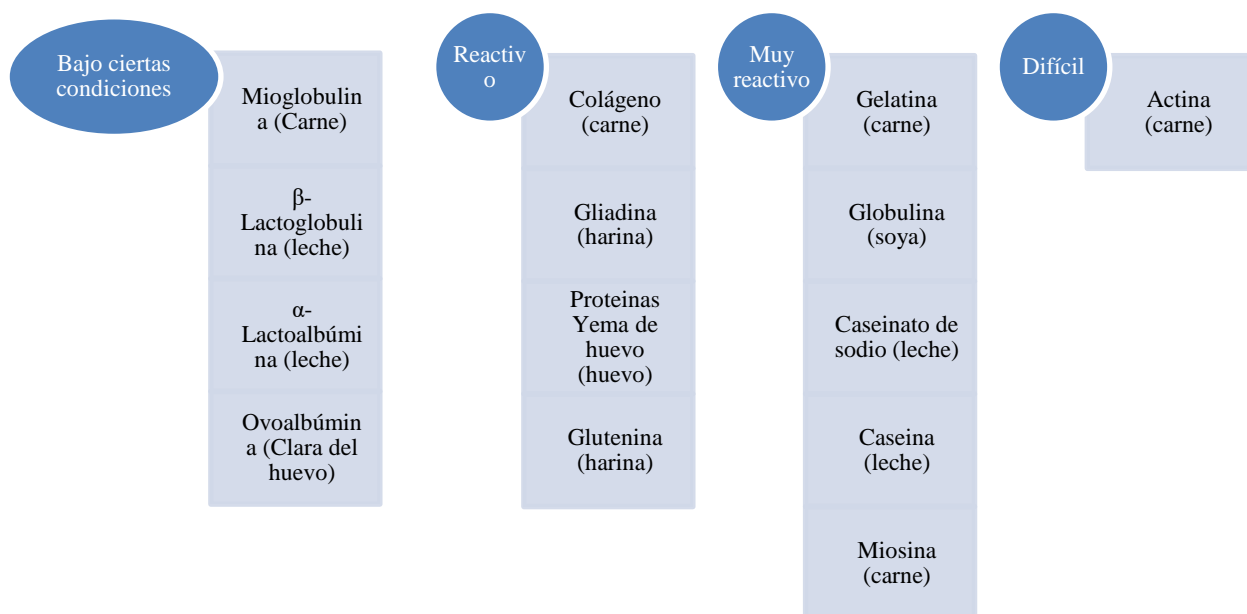


Figura 5: Grado de especificidad por los sustratos de la TGasa (Fuente: adaptación de (Barreiro & Seselovsky, 2003))

2.3. La TGasa según la legislación

En la actualidad, la legislación aplicable sobre el uso de enzimas en el procesado de alimentos está regulada por cada país. A nivel comunitario el reglamento 1332/2008 estableció las normas para la aplicación de enzimas alimentarias que desempeñan no solo una función tecnológica sino que también actúan como coadyuvantes tecnológicos según la normativa (Agència de Salut Pública de Catalunya, 2015). Este reglamento establecerá que solo las enzimas alimentarias que figuren en la lista comunitaria podrán comercializarse como tales y utilizarse en alimentos y no podrá comercializarse ningún alimento preparado con una enzima alimentaria que no cumpla con el presente reglamento y sus aplicaciones.

Por otra parte, en marzo de 2011, la Comisión Europea publicó una modificación del Reglamento 1331/2008 que establece el procedimiento de autorización de las enzimas alimentarias.

Como coadyuvantes tecnológicos, las TGasas se utilizan intencionadamente en la elaboración de productos alimenticios para llevar a cabo un fin tecnológico. Pueden estar presentes en producto acabado pero no se han descubierto posibles aspectos nocivos para la salud, ya que, la enzima estaría inactivada o los sustratos para que la enzima haga su función se habrían agotado (Agència de Salut Pública de Catalunya, 2015).

2.4. Funciones de la TGasa en alimentos

Gracias a su funcionalidad innovadora, la TGasa permite el desarrollo de nuevos productos tales como carnes reconstruidas, pescados, frutos de mar, lácteos, patés, productos de panificación o ingredientes proteicos (Barreiro & Seselovsky, 2003). En la Tabla 1 vemos las funciones de la TGasa actuando por ejemplo como texturizante, espesante, capaz de reestructurar en frío sin aplicar tratamiento térmico, etc.

FUENTE	PRODUCTO DIRIGIDO	EFFECTO PRINCIPAL	REFERENCIAS
<i>Carne</i>	Geles bovinos Geles porcinos Productos cárnicos	<ul style="list-style-type: none"> Mejora de la retención de agua y apariencia Efecto sobre el color y sabor <ul style="list-style-type: none"> Capacidad de unión otorgando estructura y mejorando la textura 	(Barreiro & Seselovsky, 2003)
<i>Pescado</i>	Surimi, mariscos	<ul style="list-style-type: none"> Mejora de la calidad Capacidad de formación de geles 	(Alvarez Anchundia, 2015; Tsai, Lin, & Jiang, 1996)
<i>Trigo(Harina)</i>	Patatas, productos horneados, pastelería	<ul style="list-style-type: none"> Mejora de propiedades funcionales y mejoramiento en calidad sensorial Mejora la textura y aumenta el volumen 	(Vergara Olivares, 2011)
<i>Soja</i>		<ul style="list-style-type: none"> Mejora de la textura y prolongación de su vida útil 	(Kwan & Easa, 2003)
<i>Frutas y vegetales</i>	Cereales	<ul style="list-style-type: none"> Conservación 	(Takagaki, Narakawa, & Uchio, 1991)
<i>Proteína</i>	Entrecruzados proteicos	<ul style="list-style-type: none"> Mejora en la composición de aminoácidos Reducción de alérgenos 	(Aguilar-Zárate et al., 2012; Bonisch, heidebach, & kulozik, 2008)
<i>Proteínas de la leche</i>	Emulsión Leche tratada	<ul style="list-style-type: none"> Mejora de la estabilidad, floculación fuerte 	(Lorenzen, Neve, Mautner, &

	Geles	<ul style="list-style-type: none"> • Características de cuajo mejoradas • Incremento en fuerza de corte y dureza • Mejora de retención de agua <ul style="list-style-type: none"> • Formación de microestructura más fina 	Schlimme, 2002; Pagani, 2015; Zimmermann & Espinoza, 2010)
<i>Gelatina</i>	Alimentos dulces	<ul style="list-style-type: none"> • Alimentos de bajas calorías con buena elasticidad y textura 	(Barreiro & Seselovsky, 2003; Caro Calderón, 2011)

Tabla 1: Principales funciones de la transglutaminasa

2.4.1. TGasa en yogur y queso fresco

Los alimentos lácteos son un grupo bastante estudiado en la industria alimentaria. Los beneficios que aporta esta enzima en el yogur y queso fresco se exponen en la siguiente Tabla 2:

FUNCIONES DE LA TGasa EN LÁCTEOS	
YOGUR	QUESO FRESCO
<ul style="list-style-type: none"> • Aumenta la viscosidad del yogur • Mayor estabilidad reológica durante almacenaje mejorando su dureza del gel <ul style="list-style-type: none"> • Reducción del costo: • Optimización de la proteína • Aumenta la estabilidad física a través de la reducción de la sinéresis • Aumenta la cremosidad /textura más suave <ul style="list-style-type: none"> • Hace a los productos bajos en grasa, más ricos 	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento del rendimiento • Mejora de la feteabilidad (tajabilidad) de quesos, reduciendo las mermas • El mantenimiento de la calidad durante la vida útil • Reducción de sinéresis en queso tipo fresco. • Aumento de la textura (firmeza)

Tabla 2:Propiedades de la TGasa en yogur y queso (Carlos & Carreño, 2007)

Entre el grupo de proteínas lácteas se distinguen dos clases: las caseínas, organizadas en forma de conglomerados llamados micelas de caseína, estables al calor e insolubles a pH 4,6; y las proteínas séricas, que precipitan a pH 4,6 y son inestables al calor (Zimmermann & Espinoza, 2010).

La capacidad de las micelas para mantener la integridad de su estructura bajo condiciones desfavorables es mejorada con el entrecruzamiento inducido por transglutaminasa. Cuando toda la caseína micelar se ha entrecruzado, las micelas se vuelven completamente estables contra la ruptura y comienzan a comportarse como un gel (Corredig, 2009).

Hay 4 tipos de caseína: α 1-, α 2-, β - y κ -caseína. La κ -caseína es soluble en calcio e interactúa y estabiliza a las caseínas insolubles en calcio formando un estado coloidal estable dentro de la leche (Caro Calderón, 2011). La κ -caseína ha demostrado ser la más susceptible a formar enlaces en leche sin calentar, seguida por la β -caseína. La caseína de la leche no tiene por sí misma la capacidad para formar geles estables, aunque se les aplique calor, pero gracias a la reacción con TGasa es posible generar sistemas gelificados con buena resistencia (Kuraishi, Yamazaki, & Susa, 2001).

Por su parte, las proteínas séricas son un grupo conformado por β -lactoglobulina y la α -lactoalbúmina. En su estructura nativa son menos susceptibles al entrecruzamiento entre proteínas debido principalmente a su conformación globular estabilizada por puentes disulfuro (Ilicic et al., 2008). En cambio, si se desnaturalizan, facilitan la interacción de grupos de proteínas séricas con caseína especialmente del tipo kappa y pueden producir geles con buenas propiedades de textura.

La incubación con TGasa no cambia el tamaño micelar de la caseína si esta se encuentra en leche no concentrada. Sin embargo, cuando la leche es concentrada y es incubada con transglutaminasa, puede ocurrir gelación, y se lleva a cabo entrecruzamiento intermicelar y no intramicelar (Caro Calderón, 2011). Si la leche es incubada por algunas horas incrementa su viscosidad y fuerza del gel formándose una microestructura muy fina (Oner, Karahan, Aydemir, & Aloglu, 2008).

La leche cruda o fresca, leche sin un tratamiento térmico elevado, se ha visto que podría contener un inhibidor de TGasa. Si no hay un calentamiento previo, los agregados de κ -caseína presentes en la superficie micelar no estarían estabilizadas y no habría entrecruzamiento (Corredig, 2009).

• YOGUR

El proceso de elaboración del yogur es a través de una gelificación ácida. Por adición de ácidos, las caseínas alcanzan su punto isoelectrico y empiezan a precipitar haciéndose insolubles y se

desmineralizan provocando la desestabilización del complejo de las caseínas. Ese proceso hace que las caseínas insolubles se agrupen formando agregados proteicos (Mounsey et al., 2005). El retículo formado encierra parte de la fase acuosa. Los enlaces que forma el retículo tienen naturaleza hidrófoba y electrostática por lo que el coagulo será frágil, sin rigidez, ni compacidad, friable y poco contráctil. La enzima TGasa ayudaría a formar un gel más estable y con capacidad para retener agua al tener la capacidad de unir proteínas entre sí formando unos enlaces intra e intermoleculares más fuertes (Lorenzen et al., 2002). Al mismo tiempo, se mejoraría la cremosidad y viscosidad del producto; así como una mayor estabilidad reológica durante el almacenaje (Mohamad, Maskat, Omar, & Kashim, 2012).

En el caso del yogur, la TGasa se añade con la intención de favorecer la formación de enlaces covalentes entre la κ -caseína y la β -lactoglobulina y la agregación de las proteínas séricas al ser desnaturalizadas (Zimmermann & Espinoza, 2010). La TGasa reduciría la expulsión de agua formando una red más compacta y menos permeable (Gauche, Tomazi, Barreto, Ogliari, & Bordignon-Luiz, 2009).

En un estudio hecho por Gauche (2009), se llegó a la conclusión que si se sustituía una determinada cantidad de leche por suero de leche y se añadía TGasa, los yogures hechos con esta enzima tenían menor sinéresis comparados con un yogur sin TGasa (Aprodu, Gurau, Ionescu, & Banu, 2011).

Iuliana Aprodu (2010), investigó como afectaba la TGasa en las propiedades reológicas del yogurt obtenido de leche tratada térmicamente. La viscosidad aparente del yogurt aumentó al incrementar la concentración de enzima pero siendo determinante el momento de adición de la TGasa en su efectividad (Aprodu, 2012).

En un estudio hecho por Paganini (2015), se demostró que si se reemplazaba una parte de la materia seca por la enzima transglutaminasa, se alcanzaba una mayor fuerza de gel sin cambios en la textura durante su almacenamiento.

• QUESO FRESCO

En la coagulación enzimática durante la elaboración del queso fresco, las micelas de caseína se ven modificadas por una proteólisis de κ -caseína reduciendo el tamaño de la micela y provocando una inestabilidad sérica (De sá & Bordignon-luiz, 2010). A continuación, la κ -caseína se hidroliza, y las micelas desestabilizadas se aglomeran por interacciones formando una red proteica que atrapa grasa y humedad.

Algunos estudios han demostrado que si se produce entrecruzamiento intramicelar, disminuye la susceptibilidad de rompimiento de las micelas de caseínas, ablandando las partículas que pasan a ser estables contra el rompimiento, impidiendo o retrasando la coagulación (Cheese | Dairy Processing Handbook, n.d.).

La función de la TGasa en queso es la de aumentar el rendimiento de la cuajada. Cuando se añade TGasa, la enzima de coagulación tiene tiempo suficiente para hidrolizar la κ -caseína y producir micelas de paracaseína y la consiguiente floculación de ésta. Las micelas tratadas con cuajo y sin TGasa, son incapaces de agregarse hasta que el 60% -80% de su κ -caseína ha sido destruida. La proteólisis de la κ -caseína libera α -caseína que es capaz de actuar como una reticulación covalente catalizada por TGasa y estabilizar las micelas de para-caseína disminuyendo la contracción de la cuajada con el consiguiente aumento del suero atrapado en la cuajada (Di Pierro, 2010). No obstante, si la leche ha sido incubada durante un tiempo, como más largo sea, más agregación intra e intermolecular entre micelas de caseína provocando una estabilidad micelar evitando así una desestabilización de la κ -caseína, paso esencial para que se produzca la acción óptima del cuajo (Zimmermann & Espinoza, 2010).

El uso de la TGasa afecta tanto la primera como la segunda etapa de formación del gel en la coagulación del queso. La TGasa forma enlaces entre las α -, β - y κ -caseínas y produce entrecruzamientos con la β -lactoglobulina y la α -lactoalbúmina en la cuajada (Escobar et al., 2014).

En una patente hecha por Han et al. (2003) se demostró que el peso obtenido de cuajada en un queso con TGasa era mayor que un queso sin esta enzima. No obstante, una agregación excesiva de TGasa podría hacer que el gel formado se rompiera provocando efectos indeseables como por ejemplo una textura rugosa y mal sabor (Han et al., 2003).

Algunos autores como Di Pierro (2010) y Escobar et al. (2014) hicieron un estudio en el que la enzima transglutaminasa se añadía a diferentes fases en el proceso. Se concluyó que el momento de adición de la enzima era la principal causa que afectaba en el rendimiento y obtención de mayor o menor cuajada independientemente de la dosis utilizada.

Hay fuentes que aseguran que puede haber interferencias entre renina y TGasa que perjudicarían en la obtención de un queso y su coagulación (Caro Calderón, 2011). El incremento en el tiempo de incubación de leche con TGasa como el aumento en la temperatura de pasteurización de la leche, generan un incremento gradual en el tiempo de coagulación, reduciendo así el grado de firmeza en el gel (Bonisch et al., 2008; Corredig, 2009).

3. Materiales y metodología

3.1 Introducción al experimento

Así pues, teniendo como referencia la teoría expuesta anteriormente, se desarrolló este experimento en el cual, tal y como ya se ha mencionado, se quiso ver el efecto de la TGasa de Ensis Sciences, formada por una composición específica, en yogur y queso fresco. En el caso del yogur se hicieron pruebas en textura (dureza del gel), viscosidad, sinéresis forzada y pH, mientras que en el queso se miró la dureza de la cuajada, el desuerado y rendimiento quesero.

1) Yogur:

-Objetivo principal: ver cómo afecta la TGasa de la citada empresa a las propiedades del yogur sustituyendo la leche en polvo por la TGasa y comparar principalmente los resultados entre estos yogures.

-Objetivos secundarios:

Comparar la dureza del gel del yogur con leche en polvo adicionada con los comerciales para ver si se parecen y sería comparable con los productos actualmente en el mercado

Determinar la dosis y momento óptimo para obtener un yogur con buenas propiedades tecnológicas sin la necesidad de añadir leche en polvo

2) Queso:

-Objetivo principal: mejorar la productividad del queso añadiendo TGasa y así obtener mejor rendimiento y mayor dureza de la cuajada

-Objetivos secundarios:

Determinar el momento de adición óptimo de la TGasa en la elaboración teniendo como referencia el queso control obtenido

En los dos productos se añadió la TGasa en dos momentos diferentes en su elaboración. Una dejando la TGasa incubada 24 h a 4 °C en la leche, y la otra con su adición directa durante la elaboración.

De esta manera, la hipótesis inicial es:

-En el yogur: “añadir TGasa mejora las propiedades del yogur respecto al elaborado con leche en polvo siendo determinante el momento de adición y dosis de la enzima. La mejor opción es hacer un yogur con la TGasa incubada previamente durante 24 h a la dosis más elevada”.

- En el queso: “añadir TGasa a una dosis establecida de 0,1% mejora el rendimiento quesero alrededor de un 20% más obteniendo más rentabilidad en la producción del queso”.

3.2 Yogur

3.2.1 Diseño, planificación y elaboración del experimento

En este experimento, se elaboraron yogures firmes naturales sin azúcar artesanalmente. Se utilizó leche entera fresca de pasteurización alta de la marca “X” y se almacenó en refrigeración a 4 °C. La empresa Abiasa (Avances Bioquímicos Alimentación S.L.) <http://www.abiasa.es/> nos proporcionó el cultivo liofilizado y concentrado compuesto por varias cepas simbióticas de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. La leche en polvo de marca blanca se compró en un conocido supermercado. Se escogió leche desnatada en polvo con un 1% de materia grasa para elaborar los yogures a partir de leche entera. La enzima TGasa, de origen microbiano, fue proporcionada por la empresa Ensis Sciences, S.L. Para su utilización en yogur se utilizó la “TGasa01” con una composición funcional formada por proteína de leche, lactosa y transglutaminasa y una actividad de 40-65 U/g.

Se elaboraron 4 yogures principales cada uno con una formulación concreta. De cada formulación se hicieron 6 yogures de 100 ml cada uno partiendo siempre de 600 ml. De los yogures A y C con TGasa se hicieron 4 variantes de formulación a diferentes dosis y a diferentes momentos de adición (ver Tabla 3). En los yogures A se dejó la TGasa incubada durante 24h en leche; mientras que en los yogures C se añadió directamente la TGasa en el momento de elaboración del yogurt. Todos los yogures A, B, C y D compartían la leche y fermento a 0,3% como ingredientes. En la Tabla 3 se puede apreciar los ingredientes aparte de leche y fermento de los que estaban formados los yogures elaborados. Se repitió por duplicado la prueba.

A	B	C	D (control)
TGasa01 24h 0: 0,1 % 1: 0,05 % 2: 0,035 % 3: 0,025 %	Sin ningún ingrediente añadido	TGasa01 directa 0: 0,1 % 1: 0,05 % 2: 0,035 % 3: 0,025 %	Leche en polvo 3%

Tabla 3: Formulaciones de los yogures. Todos los yogures compartían la composición del yogurt B (leche y fermento a 0,3%).

Como principal objetivo, se compararon los yogures hechos con TGasa con el yogur D como control. El yogur B se hizo para ver el comportamiento de un yogur hecho solo con fermento.

En la prueba también se analizaron yogures comerciales naturales y sin azúcar con leche en polvo como ingrediente añadido a parte del fermento y la leche. Escogimos 3 marcas conocidas X, Y y Z para compararlos con el yogur D con leche en polvo elaborado artesanalmente en Ensis Sciences.

Los pasos seguidos se detallan a continuación:

1. Se calentó la leche hasta 50 °C.
2. Se enfrió hasta 45 °C, temperatura ideal para añadir el fermento y los ingredientes correspondientes para cada yogur
3. Se mezcló bien cada yogur para que quedará todo bien disuelto
4. Se vertieron unos 100 g en cada envase de yogur y se obtuvieron así 6 yogures en cada formulación (ver Ilustración 1)
5. Se pusieron a fermentar a 45 °C durante unas 5 horas
6. Una vez los yogures coagularon, se enfriaron a temperatura de refrigeración 4 °C
7. Al día siguiente de su elaboración, se hicieron las respectivas pruebas de dureza, viscosidad, sinéresis forzada y pH



Ilustración 1: envases en que se elaboraron todos los yogures

3.2.2 Análisis del perfil de textura: dureza del gel

Para medir la dureza del gel, se utilizaron cuatro de los seis yogures de cada formulación y de los comerciales. Los yogures fueron analizados en su envase de capacidad aproximada de 100ml al día siguiente de ser elaborados. Estaban almacenados en refrigeración a 4 °C. La determinación de la dureza del gel se hizo con un texturometro (TexturePro CT V1.8 Build 31; Brookfield Engineering Labs. Inc.,USA); la velocidad operada fue de 0,5 mm/s y la distancia recorrida de 20 mm, utilizando un sensor cilíndrico de 1,5 mm de diámetro. Los datos obtenidos para la dureza fueron expresados en N.

3.2.3 Análisis de la viscosidad

La medición de la viscosidad se hizo a continuación de la dureza en los mismos yogures utilizados en dicha prueba. Se mezclaron dando unas dos rotaciones con una cuchara en el mismo envase de

cada yogur. Durante un minuto se sometieron a una rotación de 1 rpm con un spindle 64. La obtención de los datos fue en cP (centipoise).

3.2.4 Determinación de la sinéresis forzada

El índice de desuerado o sinéresis forzada se realizó de acuerdo con el método establecido por Serra et al. (2007). Se rellenaron tubos de centrifuga de 50 ml con 15 g de yogur y se centrifugaron a unos 5000 rpm durante 20 min a 20 °C.

Los resultados se expresaron en % a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Desuerado} = (\text{gramos de desuerado} / \text{gramos de yogur}) * 100$$

Se utilizó un yogur de cada formulación para el análisis del desuerado forzado y se repitió la medida de la sinéresis dos veces al igual que los comerciales. Se midió a los 10 días de su fabricación.

3.2.5 Determinación de pH

El pH se leyó el día después de la elaboración del yogur. Se midió el pH de los yogures A0, B, C0, y D. Se utilizó un pHmetro PCE-228.

3.2.6 Análisis estadístico

Las medidas obtenidas de los yogures A, B, C y D se analizaron a través de un análisis de varianza (ANOVA) y test de Tukey con un nivel de significación $p=0,05$ mediante el programa STATISTICA.

3.3 Queso fresco

3.3.1 Diseño, planificación y elaboración del experimento

En este experimento, el queso se elaboró artesanalmente a partir de una coagulación enzimática. Se utilizaron unos moldes específicos de queso fresco (100 mm x 100 mm) junto a un colador y tela quesera.

La empresa Abiasa (Avances Bioquímicos Alimentación S.L.) <http://www.abiasa.es/> nos proporcionó el cultivo liofilizado y concentrado compuesto por varias cepas simbióticas del género *Lactococcus* realizando una función puramente aromática en la producción del queso. El cuajo de origen animal, concretamente ternero, con una actividad de 1:15000 también fue proporcionado por Abiasa. El cloruro cálcico se obtuvo de una quesería local. La enzima TGasa, de origen microbiano, fue proporcionada por la empresa Ensis Sciences, S.L. Para su utilización

en queso se utilizó la “TGasa02” con una composición funcional formada por proteína de leche, lactosa y transglutaminasa y una actividad de 40-65 U/g a una dosis fija de 0,1%.

Partiendo siempre de un litro de leche se repitió la elaboración por triplicado. Se elaboró un queso control A, un queso B con TGasa añadida junto el cuajo y otro queso C incubando la TGasa durante 24 h a 4 °C en la leche.

A	B	C
Control	0,1 % de TGasa directa con cuajo	0,1 % de TGasa incubada 24 h

Tabla 4: Formulaciones del queso fresco. Todos los quesos contenían 0,5 ml de cuajo; 0,5 ml de CaCl_2 ; 1% de sal sobre el peso de cuajada y 0,15 g de fermento en 1 L de leche en cada elaboración de queso.

El proceso de elaboración se describe a continuación:

1. Se calentó la leche hasta unos 38 °C
2. Se añadió el fermento dejando reposar unos 10 minutos
3. Se añadió el CaCl_2 a unos 35 °C y se mezcló durante 1 minuto
4. Se añadió el cuajo junto con TGasa02 y se mezcló durante 1 minuto hasta su disolución
5. Se controló que la temperatura se mantuviera entre 30 °C – 38 °C durante la elaboración
6. Se dejó reposar 45 min hasta la formación de la cuajada
7. Se procedió al corte de la cuajada entre 1,5-2 cm vertical y horizontalmente y se dejó 5 min en reposo
8. Se agitaron suavemente los granos de la cuajada y se trasladaron al colador con tela quesera para que desuerara (90 min) (ver Ilustración 2)
9. Se hizo el salado del queso en 1% sobre el peso de la cuajada. Se apuntó el desuerado durante este tiempo y el peso obtenido de la cuajada al pasarla a los moldes
10. Se puso la cuajada en los moldes sin presionar
11. Se llevaron a refrigeración durante 24 h a 4 °C
12. Al día siguiente se volteó el queso
13. Al final del proceso se determinó la dureza de la cuajada, y se extrajeron conclusiones de los pesos obtenidos de cuajada y desuerado, así como el rendimiento quesero obtenido.



Ilustración 2: Fase del desuerado en la elaboración del queso

* Destacar que no hubo resultados del queso C incubando la TGasa durante 24 h ya que no cuajó.

3.3.2 Análisis del perfil de textura: dureza de la cuajada

Para medir la dureza obtenida en la cuajada de los quesos se utilizó un texturometro (TexturePro CT V1.8 Build 31; Brookfield Engineering Labs. Inc. USA). La medición se hizo al día siguiente de su elaboración a las 24 h. En el momento de la medición se sacaron de la nevera donde se conservaban en refrigeración y se pusieron en la superficie redonda del texturometro para ser analizados. La velocidad operada fue de 0,5 mm/s y la distancia recorrida de 20 mm, utilizando un sensor cilíndrico de 1,5 mm de diámetro. Los datos obtenidos para la dureza fueron expresados en N.

3.3.3 Obtención del peso de la cuajada y peso del desuerado espontaneo

Los pesos de la cuajada se obtuvieron en gramos en el momento de salar el queso y a las 24 h posteriores en refrigeración.

El peso del desuerado se obtuvo después de 90 minutos desuerando en el colador previamente a pasar la cuajada en los moldes (paso 9 de la elaboración del queso). El peso se apuntó en gramos.

3.3.4 Determinación del rendimiento quesero

Para el cálculo del rendimiento quesero se utilizó la siguiente fórmula teniendo en cuenta el peso obtenido de cuajada a las 24 h posteriores:

Rendimiento quesero = peso del queso en las 24 h / cantidad inicial de leche (%)

Para ver el incremento que tuvo en rendimiento el queso hecho con TGasa, se hizo a partir de la siguiente fórmula:

Incremento en rendimiento = (peso del queso con TGasa a las 24 h * 100) / peso del queso control a las 24 h

3.3.5 Recogida de datos

Se recogieron las medias de los resultados obtenidos en las 3 repeticiones de la elaboración del queso. No se realizó ningún tipo de análisis estadístico, pues no tendría sentido ya que, aunque se repitió 3 veces la elaboración de cada queso, era necesario más variabilidad de resultados para que pudiésemos tener unos resultados estadísticos significativos. Por esto, consideraríamos esta parte del estudio, como preliminar. Como se ha mencionado en la elaboración del queso, el queso C no tuvo resultados.

4. Resultados y discusión

4.1 Resultados y discusión del yogur

Los resultados obtenidos en los yogures mediante un análisis de varianza (ANOVA) y Tukey para ver diferencias entre ellos se presentan en las tablas Tabla 5 y Tabla 6. En la Tabla 5 se representan los resultados de dureza, viscosidad, pH y sinéresis de los yogures A0 (dosis más alta de TGasa), B, C0 (dosis más alta de TGasa) y D junto con los comerciales.

	Dureza (N)	Viscosidad (cP)	Ph	Desuerado forzado (%)
A0	4,66 ^a	$3,03 \cdot 10^5$ ^{ab}	4,57 ^a	38,60 ^b
B	1,24 ^c	$1,8 \cdot 10^5$ ^c	4,29 ^b	53,53 ^a
C0	3,52 ^b	$3,6 \cdot 10^5$ ^a	4,52 ^a	43,00 ^{ab}
D	1,61 ^c	$2,5 \cdot 10^5$ ^{bc}	4,42 ^{ab}	49,73 ^{ab}
X	1,68 ^c	$2,7 \cdot 10^5$ ^{abc}	-	48,07 ^{ab}
Y	1,27 ^c	$2,3 \cdot 10^5$ ^{abc}	-	49,60 ^{ab}
Z	1,49 ^c	$2,6 \cdot 10^5$ ^{abc}	-	38,40 ^b

Tabla 5: Resultados estadísticos de los yogures A0 (TGasa 0,1 %), B, C0 (TGasa 0,1 %), D y los comerciales. Los valores con el mismo superíndice para cada variable no son distintos con $p=0,05$

En la Tabla 6, se representan los resultados entre las 4 variantes de formulaciones de los yogures A y C con diferentes dosis de TGasa y distinto momento de aplicación comparándolos con el yogur D de leche en polvo. En este caso, los métodos de medida empleados tenían una gran variabilidad y por eso no se puede decir que los resultados fuesen significativos.

		Dureza (N)	Viscosidad (cP)	Desuerado forzado (%)
A	0	4,66 ^a	$3,03 \cdot 10^5$ ^a	38,60 ^a
	1	2,97 ^b	$4,07 \cdot 10^5$ ^a	40,47 ^a
	2	3,05 ^b	$3,90 \cdot 10^5$ ^a	40,13 ^a
	3	3,35 ^b	$4,72 \cdot 10^5$ ^a	39,87 ^a
C	0	3,52 ^b	$3,60 \cdot 10^5$ ^a	43,00 ^a
	1	3,03 ^b	$2,88 \cdot 10^5$ ^a	43,02 ^a
	2	1,52 ^d	$2,66 \cdot 10^5$ ^a	44,73 ^a
	3	2,38 ^c	$3,10 \cdot 10^5$ ^a	52,13 ^a
	D	1,42 ^d	$2,50 \cdot 10^5$ ^a	49,73 ^a

Tabla 6: Resultados de los yogures A y C con TGasa comparados con yogur D con leche en polvo. Los valores con el mismo superíndice para dureza no son distintos con $p=0,05$. Para las variables de viscosidad y desuerado forzado las muestras no presentaron diferencias significativas

4.1.1 Dureza del gel

Viendo los resultados de dureza de la Tabla 5 se puede observar que si hubo diferencias significativas entre los yogures A0 y C0 respecto a B y D. Los yogures de las 3 marcas comerciales mostraron resultados similares sin diferencias significativas con D demostrando que sería comparable el yogur hecho por nosotros con los que hay actualmente en el mercado. Los yogures hechos con la dosis más alta de TGasa mostraron un valor más alto de dureza que los otros, mientras que los comerciales mostraron resultados similares al yogur con leche en polvo. El yogur B fue el que presentó los valores más bajos de dureza como era de esperar.

En la comparación entre los resultados de yogures con TGasa y leche en polvo, en la Tabla 6 se puede observar que en dureza si hubo diferencias estadísticamente significativas entre las variantes de A y C (excepto C3) respecto a D. Entre las variantes de A, excepto A0, no hubo diferencias y no se puede decir que eran diferentes entre ellos, al igual que entre las variantes de C que eran iguales entre sí, excepto C2 y C3. No obstante, se podría deducir que a una dosis más alta y un tiempo de incubación más largo de la TGasa da una mayor dureza del gel.

Viendo el Gráfico 1 sobre la dureza parece ser que una dosis en A entre 0,05- 0,025% o una dosis en C de 0,1% o 0,05% serían óptimas para obtener un yogur con mejores propiedades que uno hecho con un 3% de leche en polvo. Un yogur con 0,1% de TGasa partiendo de la formulación A parece ser el que mayor dureza nos daría y sería el ideal, pero a una dosis muy alta y mucho tiempo de incubación nos podría dar una textura granulosa y compacta en el yogur siendo desagradable para el consumidor por lo no sería descartable utilizar la formulación C a una dosis alta.

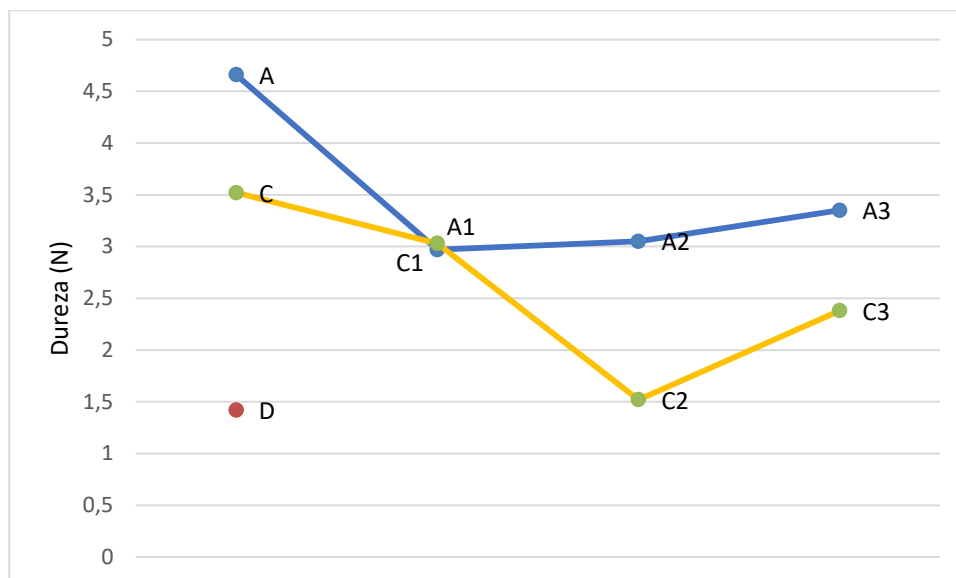


Gráfico 1: Relación entre resultados en dureza de los yogures A y C con varias dosis y diferente momento de aplicación respecto al yogur D con leche en polvo.

Los resultados obtenidos en dureza fueron bastante lógicos. El hecho que el yogur B tuviera menos dureza, es decir, un gel más débil, fue debido a que no se le añadió ningún ingrediente para dar textura ni consistencia al yogur. El yogur al ser un alimento con alto contenido en proteína, la TGasa tiene alta efectividad. El incremento en la fuerza del gel se ha relacionado con un pequeño aumento de enlaces entre las proteínas lácteas. Es por eso que los yogures con TGasa obtuvieron más dureza en el gel. La incorporación de TGasa ayuda a crear más enlaces entre residuos de glutamina y lisina que se forman de manera intermolecular e intramolecular entre micelas mostrando más resistencia a la rotura del gel. Esta enzima aumenta el grado de interacción y enlaces covalentes entre la κ -caseína y la β -lactoglobulina, que al ser desnaturalizadas son más propensas a crear enlaces (Mounsey et al., 2005).

La adición directa de TGasa junto con el fermento provoca que el entrecruzamiento entre proteínas se lleve a cabo durante la fermentación a 45 °C, una temperatura cercana a la óptima para la TGasa como fue el caso de los yogures C (Gauche, Vieira, Ogliari, & Bordinon-Luiz, 2008). Si se deja la TGasa incubada durante un tiempo su reacción será más lenta creando enlaces. Al ser incubada en yogur tiene más tiempo en agotar todos los residuos de lisina y glutamina creando un gel más fuerte entre micelas de caseína y proteínas del suero desnaturalizadas por un previo tratamiento térmico como se pudo ver en los resultados del yogur A.

4.1.2 Viscosidad

En los resultados de la Tabla 5 referente a la viscosidad vemos que los yogures A y C de la variante 0 resultaron en un valor un poco más alto que los yogures B y D. Sobre todo, C fue significativamente diferente al D, mientras que, no hubo tanta diferencia entre las viscosidades de A y D. Los yogures comerciales no mostraron diferencias significativas con el yogur D.

La viscosidad en la Tabla 6 nos muestra que no hubo diferencias significativas al comparar todas las variantes de A y C con el yogur de leche en polvo por lo que no se puede decir que los resultados fuesen significativos y diferentes estadísticamente entre sí. Aparentemente se podría deducir viendo el Gráfico 2, que la TGasa incrementó la viscosidad en los yogures. A mayor dosis obtuvimos una viscosidad más alta en los yogures donde se añadió la TGasa directa en la elaboración, concretamente una dosis de 0,1 %. Con un rango entre 0,1 % y 0,025 % de TGasa la viscosidad siguió siendo más alta que en el yogur D. No obstante, aquí no se pudo observar una clara correlación positiva entre mayor dosis, mayor viscosidad seguramente debido a la falta de más réplicas y de la alta variabilidad de resultados en esta prueba.

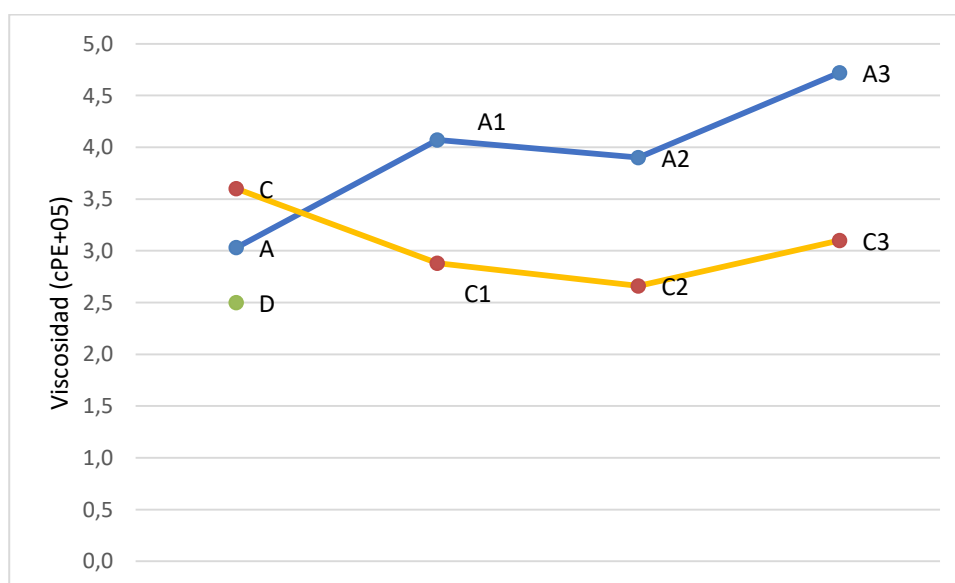


Gráfico 2: Relación entre resultados de viscosidad (cP) de los yogures A y C con varias dosis y diferente momento de aplicación respecto al yogur D con leche en polvo

La viscosidad del yogur es mayor con TGasa por su alto entrecruzamiento de proteínas. La presencia de transglutaminasa hace que se formen más enlaces entre micelas de caseína y produce un aumento en el peso molecular de los polímeros aumentando su viscosidad (Gauche et al., 2009). Los resultados en este experimento de viscosidad coincidieron con un estudio hecho por

Aprodu (2012) donde consideraba un factor clave la concentración de la enzima y su momento de aplicación en el análisis de la viscosidad como se reflejó después en nuestros resultados.

4.1.3. Sinéresis forzada

En los resultados de sinéresis forzada de la Tabla 5, obtuvimos unos valores más altos en los yogures B y D, mientras que los valores de los yogures con TGasa fueron un poco más bajos, pero con poca diferenciación entre ellos. En la Tabla 6, donde se muestra la relación entre todos los yogures A y C junto con D, no obtuvimos diferencias estadísticas entre ellos debido a la alta variabilidad, pero si se pudo apreciar algunos cambios dependiendo de la dosis y momento de aplicación.

En el Gráfico 3 podemos hacernos una idea de cómo actuó la sinéresis dependiendo de la dosis y momento de aplicación de la TGasa. Apparently, a mayor dosis y mayor tiempo de reacción de TGasa menor fue la sinéresis. La TGasa tuvo un efecto positivo incrementado la capacidad de retención de agua el yogur A0 seguido del C0 a 0,1 % respecto al yogur D.

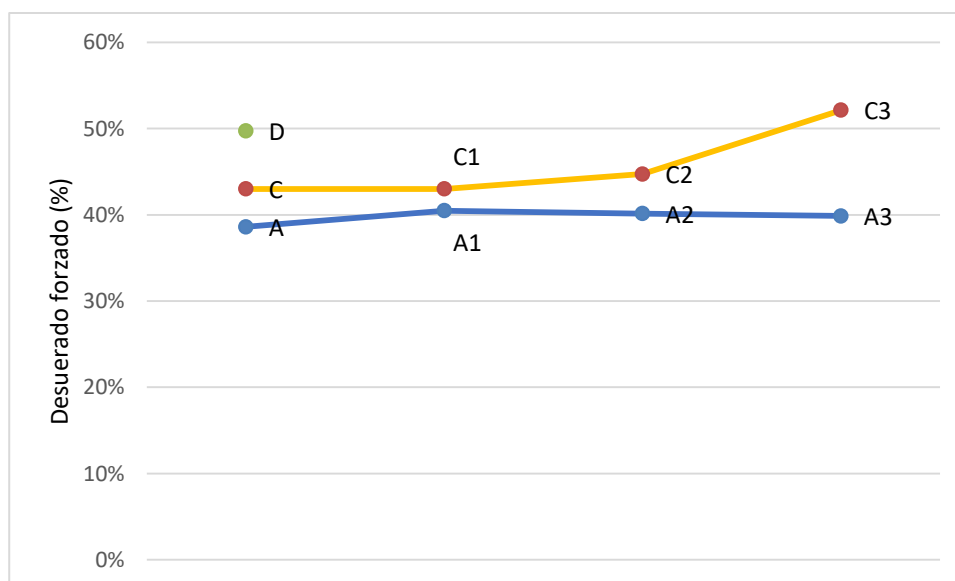


Gráfico 3: Relación entre resultados en sinéresis de los yogures A y C con varias dosis y diferente momento de aplicación respecto al yogur D con leche en polvo.

El contenido de agua presente en la leche es alrededor de un 80-90% sin adición de sólidos. El agua en estos geles es atrapada entre las caseínas formando una red en el gel. La función de la TGasa es estabilizar el gel reforzando los enlaces covalentes entre la κ -caseína y la β -lactoglobulina y la agregación de las proteínas del suero favoreciendo una disminución de la porosidad en los yogures aumentando su capacidad para ligar el agua y reducir la sinéresis tal y

como se vio en los yogures con TGasa del experimento (Gauche et al., 2009; Zimmermann & Espinoza, 2010).

4.1.4. pH

En la Tabla 5 de resultados el pH los yogures hechos con el fermento B y el yogur D con leche en polvo tuvieron un valor más bajo, resultando en un yogur un poco más ácido que los yogures A y C. Los yogures con TGasa no mostraron diferencias significativas entre ellos.

La temperatura de fermentación es muy importante para la obtención de yogures de calidad. Unas temperaturas altas favorecen el crecimiento de *Lactobacillus* y un desarrollo de acidez en el yogur. Un exceso de acidez en el yogur puede dar un sabor más pobre y desagradable para el consumidor por eso es muy importante el control del pH. A temperaturas más bajas se favorece el crecimiento de *Streptococcus* con un yogur con menos acidez. Nuestros resultados mostraron como hemos dicho anteriormente menor acidez en los yogures con TGasa. Según Lorenzen (2002), estos resultados podrían ser debido a que la TGasa interfiere con el crecimiento de los cultivos utilizados en la elaboración del yogur, resultando en fermentaciones más largas. Además, como consecuencia de la presencia de más entrecruzamientos por TGasa en el yogur se reduce la disponibilidad de péptidos libres necesarios para el crecimiento del cultivo en el yogur dando un yogur con menos post acidificación que podría ser útil en la elaboración de yogures con buen sabor sin una excesiva acidez.

4.2 Resultados y discusión del queso

Los resultados del queso fresco se recogen en la Tabla 7. Se puede observar las diferencias que obtuvimos entre el queso control (A) y el queso hecho con TGasa directa (B). El queso hecho con TGasa (C) incubada durante las 24 h como se hizo en yogur, no mostró los resultados esperados en nuestro experimento y no se pudo comparar.

	Dureza (N)	Peso cuajada al salar (g)	Peso cuajada 24 h (g)	Peso desuerado (g)	Rendimiento queso (%)	Incremento en rendimiento (%)
A	3,16	306,2	251,73	700,47	25 %	
B	6,07	382,13	296,4	624,53	30 %	17%

Tabla 7: Resultados de los quesos de cada medida representado con las medias. Los resultados de rendimiento fueron en función del peso a las 24 h.

En referencia al queso con la TGasa incubada 24 h del que no obtuvimos resultados, una posible explicación del porque no se formó la cuajada, según Caro Calderón (2011), podría ser por la influencia que tiene la TGasa en el enzima de coagulación (renina o quimosina). Como más tiempo de incubación con TGasa, más entrecruzamientos se producen entre los residuos de glutamina de la κ -caseína incluidos los que hay en la parte hidrofílica del caseino-macropéptido reduciendo así la hidrólisis de la κ -caseína por quimosina. Esto también fue demostrado por Bönisch et al. (2008) en donde se producía una menor liberación del caseino-macropéptido hidrofílico al suero al utilizar renina en leche previamente tratada con transglutaminasa obteniendo así una cuajada débil sin consistencia al no poder producirse la hidrólisis de las caseínas.

4.2.1 Dureza de la cuajada

Como se puede observar en la Tabla 7 y el Gráfico 4, el queso A obtuvo menor dureza que el queso B. Esta diferencia se repitió en las 3 veces que elaboramos el queso.

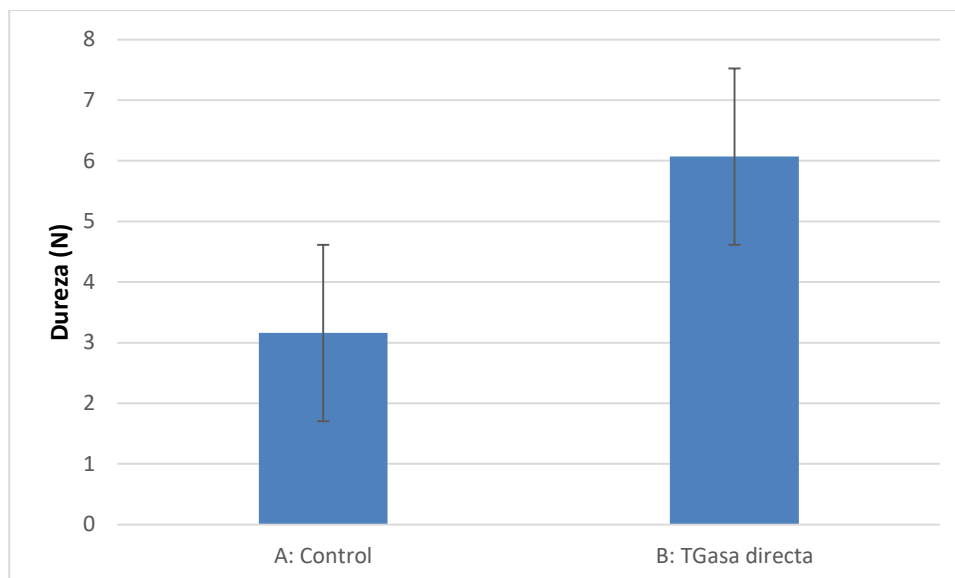


Gráfico 4: Diferencias en dureza expresada en N entre los dos quesos elaborados

Con una cantidad de 0,1% de TGasa el queso obtenido tuvo una mayor dureza. Una posible explicación sería que la enzima de coagulación añadida al mismo tiempo que la TGasa tuvo más tiempo de hidrolizar toda la κ -caseína y producir mayor número de micelas de paracaseína agregadas que el queso sin TGasa. Según Mounsey (2005) la TGasa forma una red de gel más compacta y con mayor dureza en la cuajada. En cambio, solo con adición de cuajo en el queso, es conocido que solo un 60-80% de la κ -caseína es hidrolizada y por lo tanto no se pueden formar tantos agregados de micelas de paracaseína haciendo que la cuajada formada no sea tan firme al corte.

La TGasa produce cambios en los entrecruzamientos, favoreciendo enlaces entre no solo caseínas, sino también entre algunas proteínas del suero (entre las α - β - y κ -caseínas) que quedan libres en la hidrolisis de las micelas (Di Pierro, 2010).

4.2.2 Pesos de los quesos y desuerado espontáneo durante la cuajada

Los quesos control obtuvieron un peso de cuajada menor que los de TGasa tanto al salar como en las 24 h, al mismo tiempo que, durante la formación de la cuajada el desuerado fue menor en los quesos elaborados con la enzima tal y como se ve representado en los resultados de la Tabla 7. En el Gráfico 5, se ven estas diferencias.

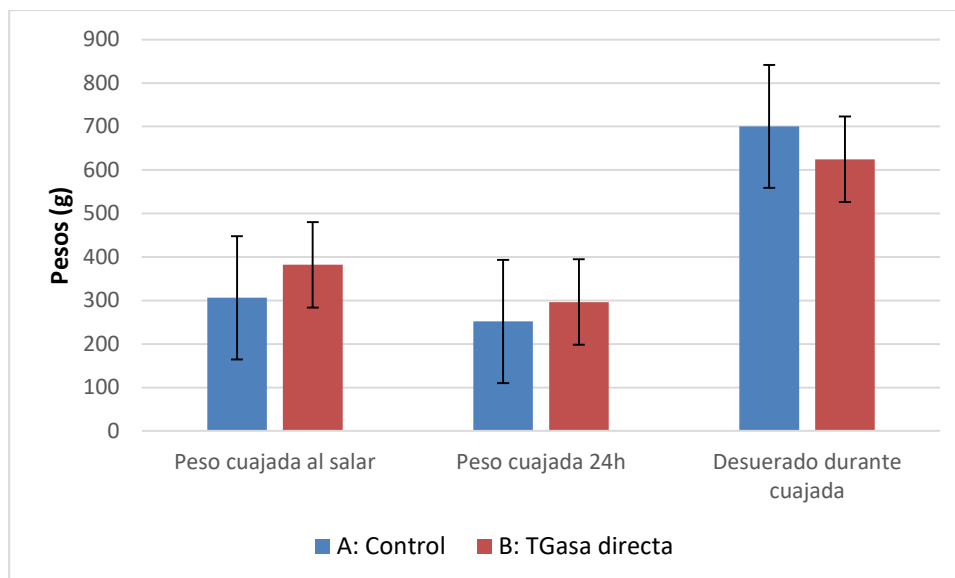


Gráfico 5. Diferencias entre pesos y desuerado en los quesos

En lo que respecta al desuerado hasta el momento del salado, el queso B, tuvo menos sinéresis espontánea que el control A, siempre partiendo de la misma cantidad de leche. La TGasa actúa creando enlaces entre proteínas del suero y caseínas que aportaron más estabilidad proteica con menos porosidad reduciendo la sinéresis (Han et al., 2003). Esta acción de la TGasa favoreció un aumento del peso de cuajada junto con una mayor retención de proteínas séricas en el entramado proteico haciendo que el desuerado del queso B fuera menor que el queso control A. En la coagulación enzimática, la κ -caseína se hidroliza, y las micelas desestabilizadas se aglomeran por interacciones formando una red proteica que atrapa grasa y humedad y la adición de TGasa favorece aún más esto dando un queso como el B (De sá & Bordignon-luiz, 2010).

4.2.3. Rendimiento quesero e incremento en rendimiento

En la Tabla 7 vemos el rendimiento quesero expresado en porcentaje respecto al peso obtenido durante el queso a las 24 h de su elaboración. En el Gráfico 6 vemos que tuvo mejor resultado el queso B con TGasa obteniendo un 25% en el A frente a un 30% en el queso B.

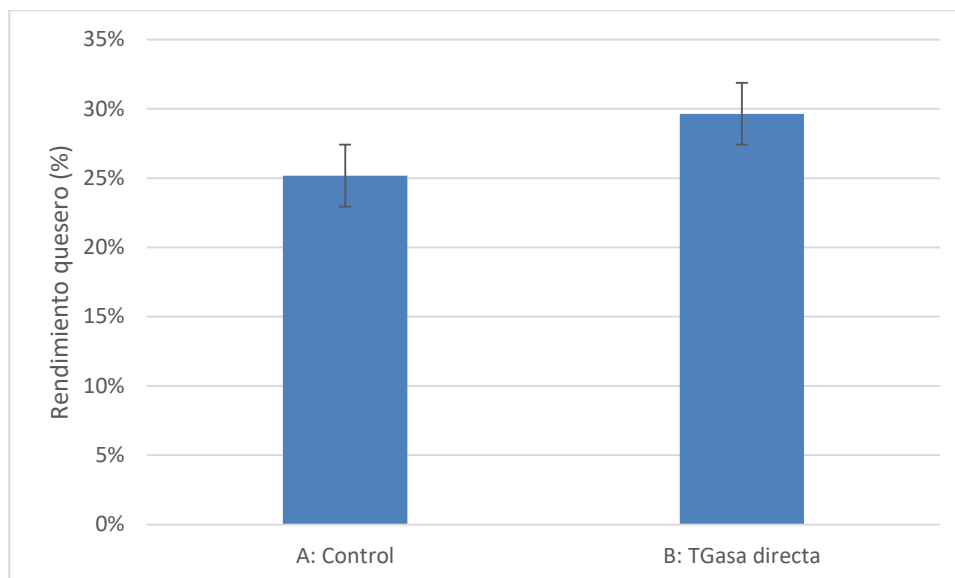


Gráfico 6. Diferencias de rendimiento quesero entre los quesos

El incremento en rendimiento del queso hecho con TGasa respecto al control también se puede observar en la Tabla 7 donde obtuvimos un 17% de incremento con la misma cantidad de leche. La TGasa forma enlaces entre las α -, β - y κ -caseínas produciendo mayor entrecruzamiento entre ellas reteniendo más cantidad durante la formación de la cuajada y disminuyendo la liberación de proteínas del suero favoreciendo un aumento del rendimiento quesero aumentando la rentabilidad del producto (Caro Calderón, 2011).

Según los resultados obtenidos en rendimiento, podríamos decir que en el queso es determinante el momento de adición de la enzima TGasa siendo más efectiva su adición junto con el cuajo. Considerar el mejor momento de adición de la enzima TGasa junto con el cuajo, coincide con un estudio hecho por Escobar (2014) donde elaboraron quesos Dambos uruguayos en que añadían la TGasa en tres momentos diferentes. Añadían la TGasa con el cuajo, la TGasa después del corte y, por último, la añadían en pre-incubación en frío. Concluyeron, al igual que en nuestro estudio, que la opción de TGasa junto con cuajo es la que presenta menor tiempo de coagulación con un mejor rendimiento, mientras que, la pre-incubación de la TGasa puede causar inhibición de la hidrólisis en la primera fase de la coagulación.

A continuación, en la Figura 6 se muestra una imagen hecha durante la elaboración artesanal del queso fresco donde podemos apreciar la diferencia en rendimiento en cada queso obtenidas con una cantidad de TGasa del 0,1%.



Figura 6: Queso control A (Izquierda)/queso con TGasa B (derecha)

5. Futuras mejoras

Para que haya significancia estadística es importante que se hagan varias repeticiones de cada prueba y realizar más variabilidad de métodos en el estudio para tener más referencias y poder realizar un estudio estadístico más fiable.

Destacar también que algunos resultados no fueron los esperados por lo que se tendrían que hacer más estudios y pruebas. Seguramente fue debido a que no se hicieron en el mismo día o los mismos pasos y con la precisión requerida.

Teniendo en cuenta que en el yogur el objetivo era sustituir la leche en polvo por TGasa y ver sus mejoras, se podría haber hecho una evaluación del producto a lo largo de su almacenamiento y lo mismo con el queso para ver si las mejoras obtenidas variaban a lo largo de su vida útil. También nos hubiera dado más datos un análisis sensorial de los productos.

6. Conclusiones

El entrecruzamiento enzimático de proteínas de leche por TGasa, puede ser un método efectivo para mejorar las propiedades de productos lácteos como leche y queso fresco. La efectividad de la TGasa depende mucho del momento de agregado, concentración de la enzima y temperatura.

Su adición en el yogur nos permite obtener un producto con un pH con menos post acidificación y una viscosidad aparentemente mejorada respecto al yogur en polvo actuales en el mercado, sobre todo, añadiendo la enzima a una dosis alta con la formulación C. La mejor opción en términos de dureza y sinéresis sería utilizar la formulación A en dosis más bajas, ya que, a una dosis de 0,1% podría dar una textura demasiado granulosa y compacta en el yogur a lo largo de sus días de almacenamiento.

El mayor rendimiento quesero se dio al incorporar TGasa junto con el cuajo. Con los estudios hechos en quesos se constató que a una dosis de 0,1% la TGasa es efectiva obteniendo casi un 20% más de incremento en rendimiento respecto al control. Los quesos hechos con TGasa con cuajo mantienen las características propias del queso durante su elaboración, pero con mayor dureza y menos sinéresis, lo cual es un atributo deseable para obtener mejores características de feteabilidad haciendo el queso más agradable para el consumidor. Eso sí, se tendría que asegurar y hacer más estudios para ver si a esta dosis no afecta al sabor y su textura a lo largo de su vida útil.

A pesar de la gran cantidad de estudios realizados en este campo, se tendrían que hacer más, ya que todavía hay mucha diversidad de opiniones respecto a la TGasa y no se ha dado con un método ideal, sino que cada estudio abre nuevas posibilidades de mejora. Hay muchas contradicciones y diversidad de opiniones y es por eso por lo que aún queda mucho por investigar. Un futuro estudio podría ser ver el comportamiento de esta enzima durante el almacenamiento o vida útil de los productos.

6. Bibliografía

- Agència de Salut Pública de Catalunya. (2015). Transglutaminasa: avaluació dels riscos i utilització en els aliments. 2 Junio.
- Aguilar-Zárate, P., Aguilar-Zárate, M., Carrillo Inungaray, M. L., Portilla Rivera, O. M., & Alonso, J. (2012). Importancia de la producción de transglutaminasa microbiana para su aplicación en alimentos. *Revista Científica de La Universidad Autónoma de Coahuila*, 4(7).
- Alvarez Anchundia, D. A. (2015). Uso de la enzima transglutaminasa para lograr una mejor adherencia y compactación en el desarrollo de un producto reconstituido a base de trozos de camaron (*Litopenaeus vannamei*).
- Ando, H., Adachi, M., Umeda, K., Matsuura, A., Nonaka, M., Uchio, R., ... Motoki, M. (1989). Purification and Characteristics of a Novel Transglutaminase Derived from Microorganisms. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(10), 2613–2617.
- Aprodu, I. (2012). Effect of transglutaminase treatment on skimmed yogurt properties. *Food Technology*, 36(2), 20–30.
- Aprodu, I., Gurau, G., Ionescu, A., & Banu, I. (2011). The effect of transglutaminase on the rheological properties of yogurt. *Scientific Study & Research*.

- Barreiro, F. J., & Seselovsky, R. (2003). Usos de la transglutaminasa en la industria alimentaria. Elaboración de carne reconstituida. Invenio. Universidad del Centro Educativo Latinoamericano.
- Bonisch, M., Heidebach, T., & Kulozik, U. (2008). Influence of transglutaminase protein cross-linking on the rennet coagulation of casein. *Food Hydrocolloids*, 22(2), 288–297.
- Carlos, H. P., & Carreño, F. G. (2007). Transglutaminasas: de Importante Papel Fisiológico en los Seres Vivos al Desarrollo Novedoso de Tecnología de Alimentos. *BioTecnología*, 10(1), 21–27.
- Caro Calderón, D. A. (2011). Efecto de la adición de transglutaminasa y carragenina en geles lácteos inducidos por renina. Instituto politécnico nacional.
- CHEESE | Dairy Processing Handbook. (n.d.). Retrieved June 17, 2017, from <http://dairyprocessinghandbook.com/chapter/cheese>
- Corredig, M. (2009). Whey processing, functionality and health benefits. *Trends in Food Science & Technology*, 11(20), 599.
- De Sá, E. M. F., & Bordignon-Luiz, M. T. (2010). The effect of transglutaminase on the properties of milk gels and processed cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 63(2), 243–251.
- Di Pierro, P. (2010). Transglutaminase-Induced Chemical and Rheological Properties of Cheese Transglutaminase-induced Modification of Cheese. *Food Biotechnology*, 24(2), 107–120.
- Escobar, D., Arcia, P., Curutchet, A., Pelaggio, R., Urrestarazu, P., & Márquez Romero, R. (2014). Influencia de la transglutaminasa en el rendimiento de la producción de queso Dambo uruguayo. *Innotec*, (9 Ene-Dic), 24–30.
- Gauche, C., Tomazi, T., Barreto, P. L. M., Ogliari, P. J., & Bordignon-Luiz, M. T. (2009). Physical properties of yoghurt manufactured with milk whey and transglutaminase. *LWT - Food Science and Technology*, 42(1), 239–243.
- Gauche, C., Vieira, J. T. C., Ogliari, P. J., & Bordignon-Luiz, M. T. (2008). Crosslinking of milk whey proteins by transglutaminase. *Process Biochemistry* (Vol. 43).
- Han, X. Q., Pfeifer, J. K., Lincourt, R. H., & Shuerman, J. M. (2003). Process for making a cheese

- product using Transglutaminase. U.S. Patent No. 6; 572; 901. Washington,DC: United States Patent and Trademark Office.
- Illicic, M., Caric, M., Milanovic, S., Dokic, L., Djuric, M., Bosnjak, G., & Durakovic, K. (2008). Viscosity changes of probiotic yoghurt with transglutaminase during storage. *Acta Periodica Technologica*, 39, 11–19.
- Kuraishi, C., Yamazaki, K., & Susa, Y. (2001). Transglutaminase: Its utilization in the food industry. *Food Reviews International*, 17(2), 221–246.
- Kwan, S. W., & Easa, A. M. (2003). Comparing physical properties of retort-resistant glucono- δ -lactone tofu treated with commercial transglutaminase enzyme or low levels of glucose. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie*, 36(6), 643–646.
- Lorenzen, P. C., Neve, H., Mautner, A., & Schlimme, E. (2002). Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on functional properties of set-style yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 55, 152–157.
- Mohamad, A. B. B., Maskat, M. Y., Omar, A. F. B., & Kashim, M. I. A. B. M. (2012). The Use of Transglutaminase Enzymes in Food: Is There Any Issue of Lawful and Unlawful in Islam? *Research Journal of Applied Sciences*, 7(1), 48–53.
- Motoki, M., & Kumazawa, Y. (2000). Review Recent Research Trends in Transglutaminase Technology for Food Processing Search for TGase for industrial uses. *Food Sci. Tec'hnol. Res*, 6(1), 151–160.
- Motoki, M., & Seguro, K. (1998). Transglutaminase and its use for food processing. *Trends in Food Science & Technology*, 9(5), 204–210.
- Mounsey et al. (2005). Influence of transglutaminase treatment on properties of micellar casein and products made therefrom Influence of transglutaminase treatment on properties of micellar casein and products made therefrom. *Le Lait*, INRA Editions, 85(4), 405–418.
- Nonaka, M., Tanaka, H., Okiyama, A., Motoki, M., Ando, H., Umeda, K., & Matsuura, A. (1989). Agricultural and Biological Chemistry Polymerization of Several Proteins by Ca^{2+} - Independent Transglutaminase Derived from Microorganisms. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(10), 2619–2623.
- Oner, Z., Karahan, A. G., Aydemir, S., & Aloglu, H. S. (2008). Effect of Transglutaminase on

- Physicochemical Properties of Set-style Yogurt. *International Journal of Food Properties*, 11(1), 196–205.
- Pagani, C. (2015). Uso de TG (transglutaminasa) en yogures y quesos.
- Serra, M., Trujillo, A. J., Quevedo, J. M., Guamis, B., & Ferragut, V. (2007). Acid coagulation properties and suitability for yogurt production of cows' milk treated by high-pressure homogenisation. *International Dairy Journal*, 17(7), 782–790.
- Shleikin, A., Gorbatsky, A., & Danilov, N. (2008). The use of transglutaminase in food processing. *Foodbalt*, 51–54.
- Takagaki, Y., Narakawa, K., & Uchio, R. (1991). Coating of vegetables and fruits with transglutaminase and proteins for preservation. *Jpn Kokai Tokkyo Koho JP*, 3272639.
- Tsai, G. J., Lin, S. M., & Jiang, S. T. (1996). Transglutaminase from *Streptomyces* *ladakanum* and application to minced fish product. *Journal of Food Science*, 61(6), 1234–1238.
- Vergara Olivares, P. M. (2011). Efecto de adición de enzima transglutaminasa en el desarrollo de pan a base de harina de quínoa (*Chenopodium quinoa* Willd).
- Zimmermann, K., & Espinoza, H. R. (2010). Estructura y funcionalidad de proteínas lácteas: Efecto de modificaciones inducidas por medios físicos, químicos y enzimáticos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 4(2), 24–37.